

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

MEDICINAL COMPLEX

Patent Number: JP11092405
Publication date: 1999-04-06
Inventor(s): INOUE KAZUHIRO; SUZAKI HIROSHI; IKEDA MASAHIRO
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD; DDS KENKYUSHO:KK
Requested Patent: ☐ JP11092405
Application Number: JP19970254780 19970919
Priority Number(s):
IPC Classification: A61K47/48
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject complex capable of site-specifically delivering a medicinal complex, staying in blood for a long time, and useful for anti-tumor medicines, anti-inflammatory medicines and the like by binding a carboxyalkylpullulan polyalcohol to the residue of a medicinal compound through a specific spacer.

SOLUTION: This medicinal complex is obtained by binding a carboxy 1-4C alkylpullulan polyalcohol (especially a carboxymethylpullulan polyalcohol having a mol.wt. of 5,000-500,000 and a carboxymethylation degree of 0.01-2.66) to the residue of a medicinal compound (especially doxorubicin or the like) through a spacer comprising an amino acid or a spacer comprising 2-8 amino acids bound to each other through peptide bonds [especially (N-terminal)-Gly-Gly-Phe-Gly].

Data supplied from the esp@cenet database - 12

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-92405

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月6日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/48

Z

// C 0 7 K 5/103

C 0 7 K 5/103

審査請求 未請求 請求項の数26 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平9-254780

(22) 出願日 平成9年(1997) 9月19日

(71) 出願人 000002831

第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(71) 出願人 390031462

株式会社ディ・ディ・エス研究所

東京都中央区京橋二丁目4番16号

(72) 発明者 井上 和弘

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第

一製薬株式会社東京研究開発センター内

(72) 発明者 洲崎 浩

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第

一製薬株式会社東京研究開発センター内

(74) 代理人 弁理士 今村 正純 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物複合体

(57) 【要約】

【解決手段】 例えば実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でプルランを処理して得られたプルランポリアルコールと、例えばドキシソルビシンなどの医薬化合物の残基とが1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合していることを特徴とする薬物複合体。

【効果】 腫瘍部位選択性に優れており、高い抗腫瘍作用を発揮できるとともに毒性の発現も軽減されているという特徴を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸からなるスペーサーを介してカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴とする薬物複合体。

【請求項2】 カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールを構成するプルランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でプルランを処理して得られたプルランポリアルコールであることを特徴とする請求項1に記載の薬物複合体。

【請求項3】 カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールがカルボキシメチルプルランポリアルコールである請求項1または2に記載の薬物複合体。

【請求項4】 医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求項1ないし3のいずれか1項に記載の薬物複合体。

【請求項5】 医薬化合物が濃度依存型の抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤である請求項4に記載の薬物複合体。

【請求項6】 医薬化合物が時間に依存した抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤である請求項4に記載の薬物複合体。

【請求項7】 抗腫瘍剤がドキソルビシン又は(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求項4に記載の薬物複合体。

【請求項8】 スペーサーが-X-Z-で表されるジペプチド(-X-Z-は疎水性アミノ酸(X)と親水性アミノ酸(Z)とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合して形成されるジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基から、それぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を示す)であるか、又は該ジペプチドを部分ペプチド配列として含むスペーサーである請求項5ないし7のいずれか1項に記載の薬物複合体。

【請求項9】 疎水性アミノ酸がフェニルアラニンであり、親水性アミノ酸がグリシンである請求項8に記載の薬物複合体。

【請求項10】 スペーサーが(N末端)-Gly-Gly-Phe-Gly-である請求項9に記載の薬物複合体。

【請求項11】 抗腫瘍剤の残基の導入量が1~15重量%の範囲である請求項5ないし10のいずれか1項に記載の薬物複合体。

【請求項12】 抗腫瘍剤の残基の導入量が3~10重量%の範囲である請求項5ないし10のいずれか1項に記載の薬物複合体。

【請求項13】 抗腫瘍剤の残基の導入量が4~7重量%の範囲である請求項5ないし10のいずれか1項に記載の薬物複合体。

【請求項14】 $H_2N-Gly-Gly-Phe-Gly-COOH$ で示されるペプチドのN末端がカルボキシメチルプルランポリアルコールのカルボキシル基に酸アミド結合しており、該ペプチドのC末端が(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの1-アミノ基と酸アミド結合した請求項1に記載の薬物複合体。

【請求項15】 (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン残基の導入量が2~10重量%の範囲である請求項14に記載の薬物複合体。

【請求項16】 カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールが分子量5,000ないし500,000の範囲のカルボキシメチルプルランポリアルコールであり、カルボキシメチル化度が0.01~2.66の範囲である請求項14又は15に記載の薬物複合体。

【請求項17】 カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールが分子量10,000~350,000の範囲のカルボキシメチルプルランポリアルコールであり、カルボキシメチル化度が0.1~1.0の範囲である請求項14又は15に記載の薬物複合体。

【請求項18】 カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールが分子量50,000~200,000の範囲のカルボキシメチルプルランポリアルコールであり、カルボキシメチル化度が0.3~0.6の範囲である請求項14又は15に記載の薬物複合体。

【請求項19】 (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン残基の導入量が5~7重量%の範囲であり、カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールの分子量が約83,000であり、カルボキシメチル化度が約0.5である請求項14に記載の薬物複合体。

【請求項20】 医薬化合物を結合するための薬物送達のキャリアーであって、カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールからなる薬物送達のキャリアー。

【請求項21】 カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールの分子量が5,000~500,000の範囲であり、カルボキシ C_{1-4} アルキル化度が0.01~2.66の範囲である請求項20に記載の薬物送達のキャリアー。

【請求項22】 カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールの分子量が10,000~350,000の範囲であり、カルボキシ C_{1-4} アルキル化度が0.1~1.0の範囲である請求項20に記載の薬物送達のキャリアー。

【請求項23】 カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールの分子量が50,000~200,000の範囲であり、カルボキシ C_{1-4} アルキル化度が0.3~0.6の範囲で

ある請求項20に記載の薬物送達のキャリアー。

【請求項24】 カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールがカルボキシメチルプルランポリアルコールである請求項20ないし23のいずれか1項に記載の薬物送達のキャリアー。

【請求項25】 医薬化合物の残基と結合したカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールを含む薬物複合体の製造のためのカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールの使用。

【請求項26】 医薬化合物の残基とカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールとがスペーサーを介して、又はスペーサーを介さずに結合した薬物複合体の製造のためのカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールの使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は医薬として有用な薬物複合体に関するものである。さらに具体的にいうと、本発明は、多糖誘導体であるカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールと抗腫瘍剤や抗炎症剤等の医薬化合物とをスペーサーを介して結合させた薬物複合体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓・網内系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が十分でない場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体では腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に満遍なく分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用するので、嘔吐、発熱、あるいは脱毛などの副作用を極めて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

【0003】このような手段の一つとして、多糖高分子に抗腫瘍剤を結合させて、抗腫瘍剤の血中からの消失を遅延させ、かつ、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。例えば、特公平7-84481号公報には、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基や酸アミド結合を介してダウノルビシン、ドキソルビシン、マイトマイシンC、又はブレオマイシンなどを導入した薬物複合体が開示されている。この発明におけるマンノグルカン誘導体としては、カルボキシメチル化されたマンノグルカン・ポリアルコールも用いられている。しかしながら、マンノグルカン誘導体は枝分かれが

多いので構造が複雑であり、医薬品の製造に適する均一な品質のものを入手することが困難であった。

【0004】また、国際公開 W094/19376 号には、カルボキシル基を有する多糖のカルボキシル基にペプチド鎖（アミノ酸数1〜8）が結合されており、さらにこのペプチド鎖を介してドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、又はブレオマイシンなどを結合した薬物複合体が開示されている。カルボキシル基を有する多糖としては、本来的にその構造中にカルボキシル基を有する多糖（例えば、ヒアルロン酸等）のほか、本来的にその構造中にカルボキシル基を有しない多糖（例えば、プルラン、デキストラン、キチン等）の水酸基にカルボキシ C_{1-4} アルキル基を導入するか、あるいはマロン酸やコハク酸などの多塩基性酸をエステル結合させてカルボキシル基を導入した多糖類などが例示されている。この薬物複合体は、ドキソルビシンなどの薬剤と上記多糖部分とがスペーサーを介して結合していることを構造上の特徴としており、ドキソルビシンより優れた抗腫瘍効果が得られるとともに、毒性・副作用が軽減されている。

【0005】その他、ポリアルコール化多糖誘導体を薬物の送達キャリアーとして用いた薬物複合体に関する技術について、「多糖-ペプチド-ドキソルビシン複合体に関する研究・多糖キャリアーの血中安定性と抗腫瘍効果の関係」（第10回日本DDS学会講演要旨集、279、1994）；「多糖-ペプチド-ドキソルビシン複合体に関する研究・体内動態と抗腫瘍効果」（第9回日本薬物動態学会年会講演要旨集、292、1994）；第19回研究開発動向セミナー（医薬品機構主催）要旨集、D-9、1995；及び「多糖キャリアーによる腫瘍への薬物送達に関する研究」（第12回コロイド・界面技術シンポジウム、日本化学会、講演要旨集、51、1995）などの報告がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、抗腫瘍剤や抗炎症剤などの有効成分を腫瘍部位などに対して部位選択的に移行させることができる薬物複合体を提供することにある。より具体的には、抗腫瘍剤や抗炎症剤などの医薬化合物を部分構造として含む薬物複合体であって、血中に長時間滞留することができ、かつ、腫瘍部位や炎症部位に対して部位選択的に該医薬化合物を送り込むことができる薬物複合体を提供することが本発明の課題である。また、本発明の別の課題は、上記の特徴を有する薬物複合体の製造方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決すべく国際公開 W094/19376 号に開示された薬物複合体の改良を試みた結果、カルボキシル基を有する多糖類に替えて、デキストランをポリアルコール化したデキストラン誘導体をカルボキシ C_{1-4} アルキル化したものを多糖部分として用いると、投与後の医薬が長時間にわたって高濃度で維持されるとともに、腫瘍部位や炎症部

位に対する部位選択性を大幅に改善できることを見出した。また、このような化合物では抗腫瘍効果などの主薬効が顕著に増強されている一方、毒性は低減されていることを見出した(PCT/JP97/01914)。本発明者はさらに研究を進めた結果、カルボキシアルキルプルランポリアルコールを多糖部分として含む薬物複合体が、カルボキシアルキルデキストランポリアルコールを含む上記の薬物複合体と同様の性質を有していることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

【0008】すなわち本発明は、1個のアミノ酸からなるスパーサー又はペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸からなるスパーサーを介してカルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴とする薬物複合体を提供するものである。また本発明の別の態様により、上記の薬物複合体からなる医薬；及び上記の薬物複合体を有効成分として含む医薬組成物、例えばバイアルに充填された凍結乾燥品の形態の注射用若しくは点滴用の製剤などが提供される。さらに本発明の別の態様によれば、上記の薬物複合体の製造方法が提供される。

【0009】上記の発明の好ましい態様として、カルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールを構成するプルランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール可能な条件下でプルランを処理して得られたプルランポリアルコールであることを特徴とする上記薬物複合体；カルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールがカルボキシメチルプルランポリアルコールである上記薬物複合体；医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記薬物複合体；医薬化合物が濃度に依存した抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤（より高い濃度でより強い抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤：本明細書において濃度依存型の抗腫瘍剤という場合がある）である上記薬物複合体；医薬化合物が時間に依存した抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤（より長い作用時間でより強い抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤：本明細書において時間依存型の抗腫瘍剤という場合がある）である上記薬物複合体；並びに、抗腫瘍剤がドキシロビン又は(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記薬物複合体が提供される。

【0010】また、同様に好ましい態様として、スパーサーが-X-Z-で表されるジペプチド（-X-Z-は疎水性アミノ酸(X)と親水性アミノ酸(Z)とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合して形成されるジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基から、それぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドを部分ペプチド配列として含むスパーサーである上記薬物複

体；疎水性アミノ酸がフェニルアラニンであり、親水性アミノ酸がグリシンである上記薬物複合体；スパーサーが(N末端)-Gly-Gly-Phe-Gly-である上記薬物複合体；並びに、抗腫瘍剤の残基の導入量が1~15重量%、好ましくは3~10重量%、さらに好ましくは4~7重量%の範囲である上記薬物複合体が提供される。

【0011】本発明の特に好ましい態様として、H₂N-Gly-Gly-Phe-Gly-COOHで示されるペプチドのN末端がカルボキシメチルプルランポリアルコールのカルボキシル基に酸アミド結合しており、該ペプチドのC末端が(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの1-アミノ基と酸アミド結合した上記薬物複合体；(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン残基の導入量が2~10重量%の範囲である上記薬物複合体；並びに、カルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールが、分子量5,000~500,000の範囲、好ましくは10,000~350,000の範囲、より好ましくは50,000~200,000の範囲のカルボキシメチルプルランポリアルコールであり、カルボキシメチル化度が構成糖残基あたり0.01~2.66の範囲、好ましくは0.1~1.0の範囲、より好ましくは0.3~0.6の範囲である上記薬物複合体が提供される。

【0012】本発明の別の態様によれば、カルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールからなる薬物送達のカリヤーが提供される。この発明の好ましい態様では、カルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールの分子量が5,000~500,000の範囲、好ましくは10,000~350,000の範囲、より好ましくは50,000~200,000の範囲であり、カルボキシC₁₋₄アルキル化度が構成糖残基あたり0.01~2.66の範囲、好ましくは0.1~1.0の範囲、より好ましくは0.3~0.6の範囲である。カルボキシメチルプルランポリアルコールが最も好ましいカリヤーとして提供される。この発明の別の観点からは、医薬化合物の残基と結合したカルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールを含む薬物複合体の製造のためのカルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールの使用が提供される。

【0013】この発明の好ましい態様として、医薬化合物の残基とカルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールとがスパーサーを介して結合した薬物複合体の製造のためのカルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールの使用；並びに1個のアミノ酸からなるスパーサー又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスパーサーを介してカルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴とする薬物複合体の製造のためのカルボキシC₁₋₄アルキ

ルプルランポリアルコールの使用が提供される。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の薬物複合体は、1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2〜8個のアミノ酸からなるスペーサーを介してカルボキシル-4アルキルプルランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴としている。

【0015】本発明の薬物複合体に含まれる医薬化合物の残基は、例えば、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤などの医薬としてヒトを含む哺乳類の病気の治療及び/又は予防に用いられる医薬化合物に由来し、その部分構造により構成される。もっとも、該残基が由来する医薬化合物は上記のものに限定されることはない。また、医薬化合物としてはスペーサーとの結合に関与できる1又は2以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、メルカプト基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。本明細書において医薬化合物という場合には、それ自体が医薬作用を有する化合物の主要構造をその部分構造として含み生体内で該化合物を再生することができるプロドラッグ化合物も含まれる。

【0016】より具体的には、本明細書において医薬化合物の残基とは、スペーサーと医薬化合物残基との結合が医薬化合物中の反応性官能基とスペーサー中の反応性官能基との反応（例えば脱水縮合など）により形成されたと仮定した場合において、結合後の化合物中に存在する医薬化合物に由来する部分構造を意味している。例えば、医薬化合物が $D-NH_2$ 、 $D-COOH$ 、 $D-COOR$ 、 $D-OH$ 、 $D-SH$ 、 $D-CONH_2$ 、 $D-NH-COOR$ (R は低級アルキル基等) で表される場合、医薬化合物の残基はそれぞれ $D-NH-(D-NH-CO-Q)$ など、 $D-CO-(D-CO-NH-Q)$ 、 $D-CO-O-Q$ 、 $D-CO-S-Q$ など、 $D-CO-(D-CO-NH-Q)$ 、 $D-CO-O-Q$ 、 $D-CO-S-Q$ など、 $D-O-(D-O-CO-Q)$ 、 $D-O-Q$ など、 $D-S-(D-S-CO-Q)$ 、 $D-S-Q$ など、 $D-CONH-(D-CO-NH-CO-Q)$ など、 $D-NH-CO-(D-NH-CO-O-Q)$ 、 $D-NH-CO-NH-Q$ など) で表される（カッコ内はスペーサーと医薬化合物残基との結合を示し、 Q はスペーサーから反応性官能基を除いた残りの部分構造を示す）。もっとも、スペーサーと医薬化合物残基との結合の種類は上記のものに限定されることはない。医薬化合物の残基は、スペーサーのN末端アミノ基又はC末端カルボキシル基のほか、スペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基に結合していてもよい。

【0017】医薬化合物の残基としては、例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体）、タキソール若しくはその誘導体、カンブテチン若しくはその誘導体（特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項2に記載された(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フル

オロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン等)などの抗腫瘍剤の残基を好適に用いることができる。また、例えば、コハク酸ヒドロコルチゾン、コハク酸アレドニゾロンなどのステロイド系抗炎症剤、又はメフェナム酸、フルフェナム酸、ジクロフェナク、イブプロフェン、チノリジンなどの非ステロイド系抗炎症薬の残基も好適である。

【0018】医薬化合物の残基と結合するスペーサーとしては、1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2〜8個のアミノ酸からなるスペーサーを用いることができる。より具体的には、スペーサーは、1個のアミノ酸の残基（アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）、又はペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基（N末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）の形態を有している。

【0019】好ましいスペーサーは2〜6個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基である。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、 α -アミノ酸のほか、 β -アラニン、 ϵ -アミノカプロン酸、 γ -アミノ酪酸などを用いてもよい。このような α -アミノ酸以外のアミノ酸は、多糖誘導体に近接した位置に配置されることが好ましい。

【0020】スペーサーの結合方向は特に限定されないが、一般的には、カルボキシル-4アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基にスペーサーのN末端を酸アミド結合によって結合し、医薬化合物のアミノ基にスペーサーのC末端を結合することができる。また、例えば、ペプチドスペーサーの構成単位としてリジン残基を含めておき、リジン残基の α -アミノ基及び ϵ -アミノ基をそれぞれ他のアミノ酸のカルボキシル基と酸アミド結合させると、ペプチドスペーサーの両末端がN末端になるので、医薬化合物のカルボキシル基を結合することが可能になる。さらに、スペーサー中に1個又は2個以上のジアミン化合物またはジカルボン酸化合物の残基（例えばエチレンジアミンなどのジアミンの残基やコハク酸などのジカルボン酸の残基）を構成単位として含めておき、それぞれ両末端がN末端のスペーサー及び両末端がC末端のスペーサーを利用してもよい。

【0021】スペーサーのアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スペーサーが $-X-Z-$ で表されるジペプチドの残基 (X は疎水性アミノ酸の残基を示し、 Z は親水性アミノ酸の残基を示し、 $-X-Z-$ は疎水性アミノ酸 (X) と親水性アミノ酸 (Z) とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合したジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個

の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する)であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スペーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列(例えば-X-Z-X-Z-, -X-Z-X-Z-X-Z-など)を有していてもよい。

【0022】このようなジペプチド構造を含むスペーサーを用いると、スペーサーがペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位において医薬化合物が高濃度に遊離する。上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は本発明の薬物複合体の好ましい部分構造である。医薬化合物の残基として、例えば、濃度依存型の抗腫瘍剤(例えば、ドキソルビシン)などを用いる場合には、-X-Z-で示される上記のジペプチド残基からなるスペーサー又は該ジペプチド残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを用いることが特に好ましい。

【0023】また、医薬化合物の残基として、一定の濃度以上で作用時間の持続を必要とする時間依存型の抗腫瘍剤を用いる場合にも、上記のスペーサーを用いることによって高い抗腫瘍効果を達成できる場合がある。このような抗腫瘍剤として、例えば、特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項2に記載された抗腫瘍剤が挙げられる。一般的には、上記のスペーサーに限定されることなく、抗腫瘍剤の作用機作、体内動態や毒性発現の特徴、体内での抗腫瘍剤の遊離性などの観点から好ましいスペーサーを選択する必要がある。なお、一般的に、増殖の速い癌種に対しては、短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができる上記のスペーサーを選択することが好ましい。

【0024】スペーサーの具体例を以下の表に示すが、本発明の薬物複合体に用いられるスペーサーは以下のものに限定されることはなく、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜選択可能であることはいうまでもない。表中、ペプチド配列は左側がN末端であり、C末端側に医薬化合物の残基が結合する。D-PheはD-フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸はL-アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキソルビシンを結合した薬物複合体の Walker 256 担癌ラットに対する薬効の発現の程度、または Walker 256 担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキソルビシン濃度によって判定したものである。これらのスペーサーのうち、ドキソルビシンに対しては(N末端)-Gly-Gly-Phe-Gly-等の短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができるスペーサーを用いることが好ましい。

【0025】

【表1】

(a) 遊離速度が大きいスペーサー

-Leu-Gly-
-Tyr-Gly-
-Phe-Gly-
-Gly-Phe-Gly-
-Gly-Gly-Phe-Gly-
-Gly-Phe-Gly-Gly-
-Phe-Gly-Gly-Gly-
-Phe-Phe-Gly-Gly-
-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-

(b) 遊離速度が比較的大きいスペーサー

-Gly-Gly-Phe-Phe-
-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

(c) 遊離速度が比較的小さいスペーサー

-Phe-Phe-
-Ala-Gly-
-Pro-Gly-
-Gly-Gly-Gly-Phe-

(d) 遊離速度が小さいスペーサー

-Gly-
-D-Phe-Gly-
-Gly-Phe-
-Ser-Gly-
-Gly-Gly-
-Gly-Gly-Gly-
-Gly-Gly-Gly-Gly-

【0026】プルランはマルトトリオース残基が $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で連なった水溶性の α -グルカンであり、一般的には *Aureobasidium pullulans*によってスクロースなどから細胞外多糖として生産されたものを市販品として入手することができるが、本発明の薬物複合体の製造に用いるためのプルランの由来は上記のものに限定されることはない。プルランの分子量は特に限定されないが、例えば、分子量が10,000程度から2,000,000程度のもので、好ましくは100,000程度から1,000,000程度のものを用いることができる。

【0027】本発明の薬物複合体の多糖誘導体部分を構成するカルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、カルボキシC₁₋₄アルキルプルランポリアルコールを構成するプルランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてプルランを処理して得られたものであることが好ましい。例えば、プルランに大過剰の過ヨウ素酸ナトリウムと水素化ホウ素ナトリウムとを順次作用させてプルランを実質的に完全にポリアルコール化したプルランポリアルコールは、本発明の薬物複合体の原料化合物として好適である。もっとも、プルランのポリアルコール化の方法は上記のものに限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなる方法

を採用してもよい。

【0028】カルボキシ C_{1-4} アルキル基を構成する C_{1-4} アルキルとしては、直鎖又は分枝鎖の C_{1-4} アルキル、具体的にはメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基などを用いることができるが、好ましくはメチル基を用いることができる。カルボキシ C_{1-4} アルキル化は、例えば、プルランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸、 α -クロロプロピオン酸、 α -メチル- α -クロロプロピオン酸、 β -クロロプロピオン酸、 α -メチル- β -クロロプロピオン酸、 α -クロロ酪酸、 β -クロロ酪酸、 γ -クロロ酪酸などのハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸、好ましくはクロル酢酸を反応させて水酸基を部分的又は完全にカルボキシ C_{1-4} アルキル化することにより行うことができる。

【0029】例えば、プルランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒（例えば、水、*N,N*-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）に溶解し、塩基（例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等）の存在下にハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸またはその塩を添加し、氷冷下ないし100℃程度の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。カルボキシ C_{1-4} アルキル基の導入の程度は、例えば、カルボキシ C_{1-4} アルキル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸及び塩基の量を適宜選択することにより容易に調節可能であり、そのような手段は当業者に周知である。プルランポリアルコールの水酸基に対するカルボキシ C_{1-4} アルキル化の程度は特に限定されないが、例えば、構成糖残基あたり0.01~2.66の範囲、好ましくは0.1~1.0、より好ましくは0.3~0.6の範囲である。カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールの分子量は、ゲルろ過法で測定した場合に5,000から500,000程度、好ましくは10,000~350,000程度、より好ましくは50,000~200,000程度である。

【0030】上記のカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールは、薬物送達のカリヤーとして有用である。医薬化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールとを結合させた薬物複合体は、例えば、腫瘍選択性などの優れた選択性を有しており、また高い血中濃度を長時間維持できるという特徴がある。医薬化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールとの結合としては、例えば、エステル結合などで両者を直接結合させる方法、上記に説明したスペーサーなどの適宜のスペーサーを介して両者を結合させる方法などを採用することができる。

【0031】スペーサーを介して結合する薬物複合体に関しては、上記のようにして得られるカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基に対して、医薬化合物の残基と結合させたスペーサーを結合することにより本発明の薬物複合体を製造することができ

る。スペーサーとカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基との結合は、一般的には、スペーサーのN末端アミノ基とカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させることにより形成できる。もっとも、スペーサーとカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基との結合は上記のものに限定されることはなく、他の化学結合や1又は2以上のスペーサーを利用した結合であってもよい。例えば、スペーサーのC末端カルボキシル基とカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基とにより酸無水物を形成させてもよく、また、エチレンジアミン等のジアミン化合物をスペーサーとして用いてそれぞれのカルボキシル基をジアミンの各アミノ基に酸アミド結合させてもよい。

【0032】スペーサーのN末端アミノ基とカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させる場合には、ペプチド鎖の合成に用いる通常の脱水縮合剤、例えば、*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)のような*N,N'*-ジシクロアルキルカルボジイミド類、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAPC)等のカルボジイミド誘導体、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)のようなベンゾトリアゾール誘導体のほか、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(EEDQ)などを用いることができる。また、活性エステル法や酸ハライド法などにより反応を行ってもよい。

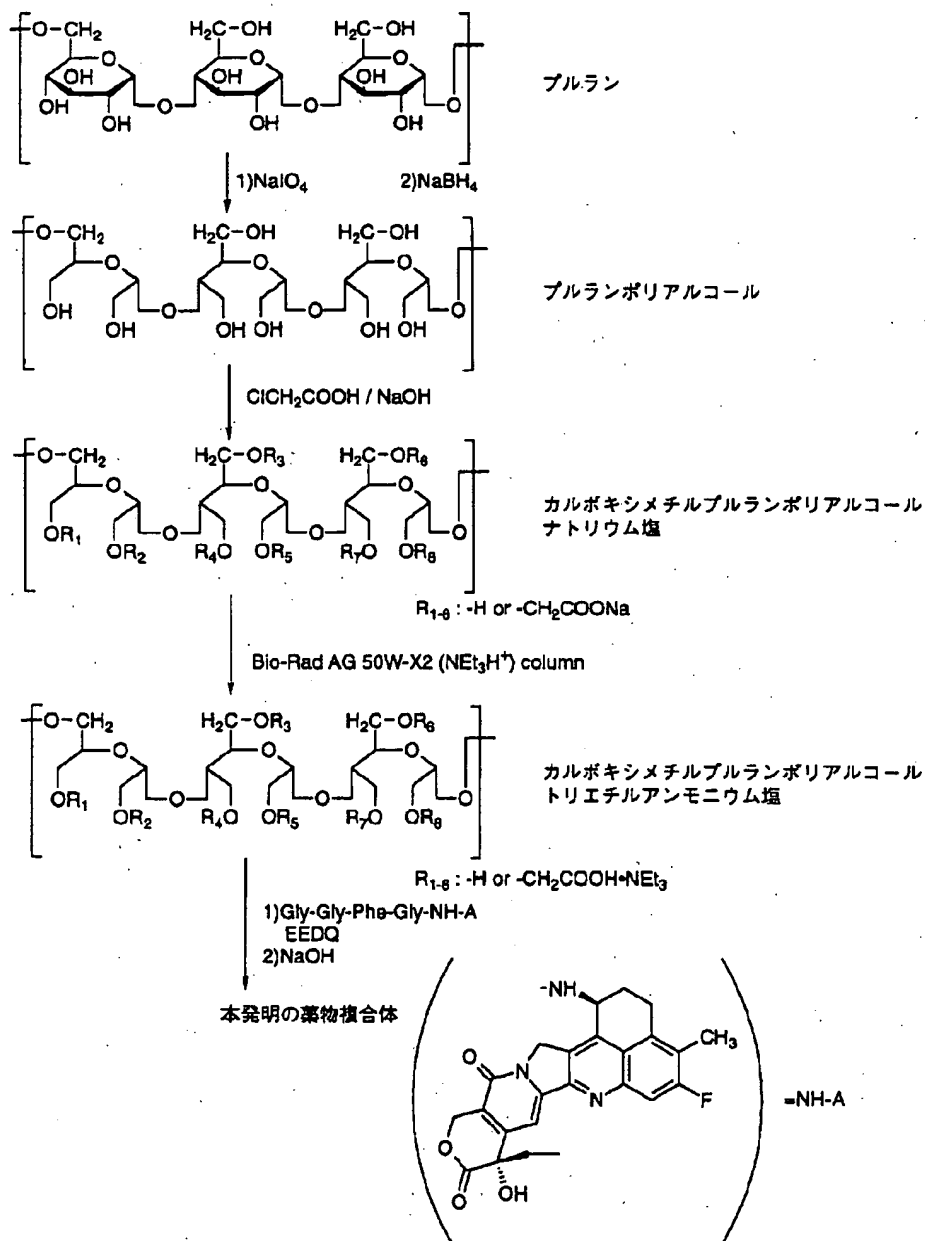
【0033】カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールに導入する医薬化合物残基の量は特に限定されないが、医薬化合物残基の物理化学的性質、並びに本発明の薬物複合体の体内動態、薬効、及び毒性などの観点から適宜選択すべきである。一般的には、0.1~30重量%、好ましくは1~15重量%、さらに好ましくは3~10重量%、特に好ましくは4~7重量%程度の範囲を選択することができる。カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールに導入された医薬化合物残基の割合は、例えば、吸光度分析などにより容易に決定することが可能である。

【0034】本発明の薬物複合体の製造方法の一例として、特開平6-87746号公報の請求項2に記載された抗腫瘍剤である医薬化合物の残基を導入する場合について、製造方法を以下のスキームに示すが、本発明の薬物複合体及びその製造方法はこのスキームに示されたものに限定されることはない。下記スキームにおいて、医薬化合物残基の導入量は、例えば1~15重量%、好ましくは2~10重量%程度である。また、下記スキーム中には、ポリアルコール類の構成単位のうち1個又は2個のカルボキシメチル基が導入された構成単位のみを例示的に記載したが、本発明の薬物複合体の多糖誘導体部分は上記構成単位の繰返しによって構成されるものではないこと

を理解すべきである。

【0035】

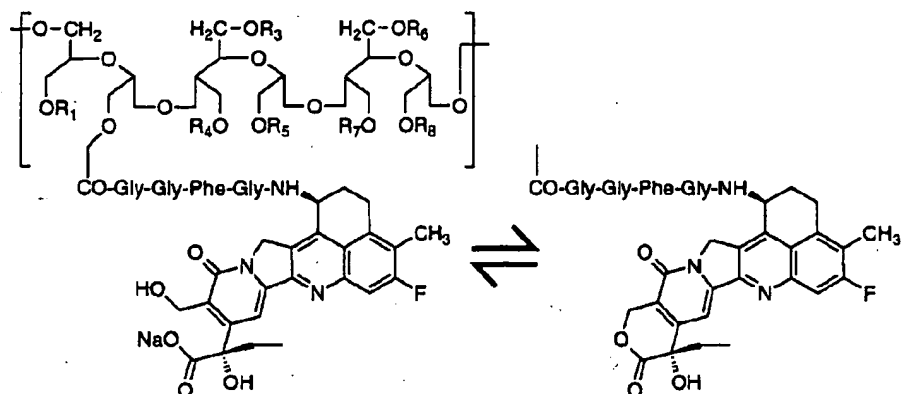
【化1】



【0036】

【化2】

本発明の薬物複合体



【0037】上記の医薬化合物は、酸性水性媒体中（例えばpH 3程度）ではラクトン環を形成した化合物（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えばpH 10程度）ではラクトン環が開環した化合物（開環体）に平衡が偏ることが知られているが、このような閉環体及び開環体に対応する残基を導入した薬物複合体は同等の抗腫瘍効果を有しており、いずれも本発明の範囲に含まれることはいうまでもない。なお、反応系中にラクトン環の開環した反応種が存在すると、ラクトン環に由来するカルボキシル基とスパーサー由来のアミノ基との間で縮合反応が進行して著しく反応収率が低下するだけでなく、目的とする均一な薬物複合体が得られない場合がある。このような副反応は反応種として選択的に閉環体を用いることによって回避することができる。

【0038】すなわち、カルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールのナトリウム塩をトリエチルアンモニウム塩に変換した後、非水系（水を含まない有機溶媒中）でカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基に対して、上記の医薬化合物の残基を結合させたスパーサーのN末端アミノ基を縮合させることにより、副反応を抑制することができ、効率的に目的物を製造することが可能になる。有機溶媒に溶解可能なカルボキシ C_{1-4} アルキルプルランポリアルコールの塩としては、例えば、トリエチルアンモニウム塩やトリメチルアンモニウム塩などのトリアルキルアンモニウム塩のほか、N-メチルピロリジン、N-メチルモルホリン、ジメチルアミノピリジン（DMAP）などの有機塩基の塩を用いることが可能である。有機溶媒としては、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどを用いることができる。

【0039】本発明の薬物複合体は、医薬化合物の残基の種類（例えば、抗腫瘍剤または抗炎症剤などの医薬化合物の残基）に応じて、所望の医薬活性を腫瘍部位や炎症部位などの局所において特異的に発現させることができ、かつ、医薬化合物自体の有する毒性を低減できるという特徴を有する。いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明の薬物複合体の多糖誘導体部分（例

えばカルボキシメチルプルランポリアルコール）は極めて優れた血中滞留性及び腫瘍・炎症部位への集積性を有するので薬物送達のキャリアーとして有用であり、本発明の薬物複合体は腫瘍選択性及び炎症部位選択性を有している。また、腫瘍部位や炎症部位ではプロテアーゼ（ペプチダーゼ）が発現されていると考えられるので、本発明の薬物複合体のスパーサーは容易に加水分解され、遊離した医薬化合物が薬効を発揮する。

【0040】本発明の薬物複合体を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用または点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、本発明の医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、pH調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができる。本発明の医薬の投与量は特に限定されないが、通常は、医薬化合物残基を構成する医薬化合物の投与量、本発明の薬物複合体中に導入された医薬化合物の残基の量、患者の状態や疾患の種類などを勘案して決定すべきである。例えば、特開平6-87746号公報の請求項2に記載された抗腫瘍剤の残基が約6重量%程度の割合で導入された本発明の薬物複合体を非経口投与する場合には、一般に一日あたり体表面積 1 m^2 につき約 $1 \sim 500 \text{ mg}$ 程度、好ましくは約 $10 \sim 100 \text{ mg}$ の範囲で一回投与し、3～4週毎に繰り返すことが好ましい。

【0041】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。実施例中、「A-NH-」は、特開平6-87746号公報の請求項2に記載された医薬化合物（実施例中、「DX-8951」という。）において、ラクトン環が開環した医薬化合物をA-NH₂で表した場合の医薬化合物残基を表す（上記のスキーム中にA-NH-で示した基：ラクトン環を形成したもの）。A'-NH-は、A-NH-で表される医薬化合物残基中のラクトン環が開環型若しくは閉環型のいずれか又はそれらの混合形態であることを示す。

【0042】また、カルボキシメチルプルランポリアル

た。このカルボキシメチルプルランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 Et_3NH^+ 型) カラムにのせ、水で溶出した。この溶出液を凍結乾燥してカルボキシメチルプルランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.0 g)を得た。

【0048】このカルボキシメチルプルランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(200 mg)をN,N-ジメチルホルムアミド(12 ml)に溶解させた。この溶液に、例2で得た 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-Aのトリフルオロ酢酸塩(42 mg)とトリエチルアミン(0.014 ml)のN,N-ジメチルホルムアミド(5 ml)溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(200 mg)を順次加え、遮光して室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液に水(300 ml)を加え、限外濾過膜 10K (フィルトロン社製)を用いて限外濾過した。膜を通過しない残留溶液を0.1N 水酸化ナトリウム水溶液で pH10 とし、濾過膜(0.16 μm , フィルトロン社製)を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩し、ついでミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物(210 mg)を得た。

【0049】本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム：東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒：0.1M NaCl、流速：0.8 ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(0.1 M トリス緩衝液、pH 9.0、0.1 mg/ml)をそれぞれ図1及び図2に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液(pH 9.0)中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ 6.2%(w/w)であった。

【0050】例4：本発明の薬物複合体の抗腫瘍作用
マウス線維肉腫 Meth A 細胞 1×10^6 個を BALB/c 系の

雄マウス(7 週齢)の右鼠蹊部皮下に移植して Meth A 担癌マウスを作成した。7 日目に注射用蒸留水に溶解した例3の薬物複合体を Meth A 担癌マウスの尾静脈内に単回投与した。移植後21日目に腫瘍を摘出して重量を測定し、腫瘍増殖抑制率を次式：腫瘍増殖抑制率(%) = $[1 - (\text{検体投与群の平均腫瘍重量} / \text{コントロール群の平均腫瘍重量})] \times 100$ により算出した。その結果、例3の薬物複合体は医薬化合物自体に比べて抗腫瘍効果の増強と有効用量域の拡大を示した。

【0051】

【表2】

被検化合物	投与量(mg/kg) ¹⁾	抑制率(%)
医薬化合物自体	60	77
	20	59
例3の化合物	10	99
	5	96
	2.5	57

¹⁾ 医薬化合物換算量

【0052】

【発明の効果】医薬化合物として抗腫瘍剤を導入した本発明の薬物複合体は、腫瘍部位選択性に優れており、高い抗腫瘍作用を発揮できるとともに、毒性の発現も軽減されているという特徴を有している。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の薬物複合体(例3)のGPC チャートを示す図である。

【図2】 本発明の薬物複合体(例3)の紫外線吸収スペクトルを示す図である。